PLATELIA™ HSV (1 + 2) IgG

96 PRUEBAS 72682

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgG HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 1 E 2) EN SUERO HUMANO

IVD

RESUMO

1. INDICACIONES DE USO

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

6. PRECAUCIONES DE USO

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION

8. PROCEDIMIENTO DEL TEST

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

10. VALIDACIÓN DEL TEST

11. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

12. LIMITACIONES DEL TEST

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS

15. PRECISIÓN

16. GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS

17. BIBLIOGRAFÍA

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 1 E 2) EN SUERO HUMANO

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El Herpes simplex virus (HSV) pertenece al grupo de los Herpesviridae del cual se conocen dos tipos: el tipo 1 (HSV-1) y el tipo 2 (HSV-2), que presentan diferencias antigénicas menores. El HSV-1 causa lesiones principalmente oral-faciales, mientras que el HSV-2 es principalmente responsable de lesiones genitales, pero esta dinstinción es sólo aproximada y ambos tipos pueden causar infecciones en ambos sitios anatómicos. HSV puede también causar de una forma de queratitis ocular y lesiones del sistema nervioso central.

El HSV puede afectar prácticamente a toda la población. La infección primaria está a menudo en una forma subclinical y se diagnostica raramente. Después de un período de latencia de variable duración, la reactivación puede ocurrir y la réplica viral puede o no dar lugar a lesiones clínicas. La infección contraída durante el nacimiento es de interés particular**,** siendo causa importante de morbosidad y de mortalidad.

Por esta razón es importante determinar el título del estado inmunitario de la paciente durante el embarazo y observar la eventual sueroconversión La presencia de IgM específicas es importante para la diágnosis de infección neonatal y de encefalitis causadas por HSV. Por otra parte, la presencia de IgM específicas indica la actividad viral en progreso, aunque no permite distinguir entre la infección primaria y la reactivación.

3. PRINCIPIO DEL METODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

El antígeno, constituido por Herpes Virus tipo 1 e 2 purificado e inactivo, está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteinas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos igG marcados con peroxidasa.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato peroxidasa.

El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE *MICROPLACA 12 x 8 pocillos recubiertos de herpes simplex virus* (color en violeta)
Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (H, seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias; colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + *CONTROL POSITIVO (1 x 1.6 mL)*
Contenido: Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos anti- HSV IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional(Calibrador 0).
Color: el color es proporcional al título de los anticuerpos.

CONTROL CUT OFF *CONTROL CUT-OFF (1 x 2.0 mL)*
Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos anti- HSV IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional(Calibrador 0).
Color: el color es proporcional al título de los anticuerpos.

CONJ *CONJUGADO (1 x 16 mL)*
Contenido: anticuerpos monoclonales anti IgG marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CONTROL IgG - *IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) (1 x 1.6 mL)* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Suero humano sin anticuerpos, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x *TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) (1 x 100 mL)* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Solución salina tamponada, concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37℃ antes de diluir.

SAMP DIL *DILUYENTE 2 (PF93611). 1 x 100 mL. Listo para su uso.* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Para la dilución de las muestras de suero.
Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS TMB *SUBSTRATO (PF93619). (15 mL). Listo para su uso.* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602). (1 x 16 mL)* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Solución de H_2SO_4 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2)
BOLSA DE PLÁSTICO (1)

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.
- Incubador a 37℃
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000) (por lo menos)
- Lavador de Microplacas (no indispensable)
- Agua Destilada o desionizada
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8℃. La fec ha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	**CONDICIONES**
MICROPLACA	6 SEMANAS 2/8℃ bolso de plástico
CONTROL	6 SEMANAS 2/8℃
CONJUGADO	6 SEMANAS 2/8℃
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8℃ ; 1 semana a 15/30℃; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8℃
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso, 2 semanas 2/8℃, 5 días a 15/30 ℃
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8℃.

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8℃

Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos , cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por via oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
    a) El tampón de lavado contiene detergentes
    b) El conjugado contiene fenol
    c) El substrato es ácido
    d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas. Para eliminarla, diluir con mucha agua

    Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121℃; los materiales desechables deb en ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben disinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requier una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una disinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de se que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluídos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30℃) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta**. **Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35℃ ó por encima de 39℃.**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" (“efecto filo”) que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37℃ en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador**.** Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
12. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
    - instalación y requisitos específicos
    - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
    - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
    - mantenimiento y servicio técnico.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8℃. Para conservaciones más largas congel ar a –20ºC. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.
No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.
El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

Método Manual
- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Wash Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla substrato.
Dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los calibradores SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo es de 1 control negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37℃. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37℃, cubriendo los pozos con la ci nta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.
Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.
Leer la Absorbancia (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.
Leer otra vez a 405 nm si están OD superiores a 2.000.

9. Procedimiento de la prueba para Platelia™ HSV IgG

Método Manual

STEP 1	Poner 100 µL de la muestra diluida/controles en los pocillos
	Incubar 45 min. a 37℃
	Lavar 4 veces (300 µL)
STEP 2	Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo
	Incubar 45 min. a 37℃
	Lavar 4 veces (300 µL)
STEP 3	Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo
	Incubar 15 min. a T.A.
STEP 4	Añadir 100 µL de Solución Bloqueante
	Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (<= 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser inferior a 0.6. La D.O. del cut-off debe ser >= 0,2 a 450 nm e >= 0,16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Resultados cualitativos
Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgG específicas para el antígeno.
Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off.
La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2

Dudoso: ± 20% del cut-off

No-inmune: si la concentración es < 0.8

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

12. LIMITACIONES

Las muestras recogidas durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativas con este procedimiento.
El nivel de las IgM anti-Herpes Simplex Virus tendría que ser determinado usando el kit Platelia™ HSV IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.
El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 17 muestras negativas al Herpes Simplex, conteniendo anticuerpos IgG contra virus como lo de la Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex, Citomegalovirus, Parotitis. En ningún caso la presencia de estos anticuerpos afectaba el test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 348 muestras, 61 de las cuales fueron negativas y 287 positivas. Las muestras fueron analizadas con otro método inmunoenzimático comercial; se encontró un acuerdo del 100% entre los dos métodos.

El kit Platelia™ HSV IgG ofrece el 100% de sensibilidad y especificidad.

15. PRECISIÓN DEL KIT Platelia™ HSV IgG

Precisión intra-ensayo

Cut Off n=15	***Lote N. 084***	***Lote N. 085***	***Lote N. 086***
D.O.	0.446	0.388	0.598
CV%	6.3	10	6.2

Precisión en series

	INDEX						
Muestra	**I serie**	**II serie**	**III serie**	**IV serie**	**V serie**	**V. Medio**	**CV%**
HSG 1	0.39	0.49	0.48	0.38	0.44	0.43	12.1
HSG 2	1.94	2.43	2.19	2.04	1.66	2.05	13.8
HSG 3	3.74	4.90	5.52	4.65	3.41	4.44	19.4
Control Pos.	6.26	6.69	7.89	7.95	5.76	6.91	14.1

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador.
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador.
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador.
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta.
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea.
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad. Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
3. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
4. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
5. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Micronbiol. 19: 730 (1984).
6. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).
7. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. J. Med. Virology 16: 1247 (1985).
8. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. J. Medical Virology 23: 135 (1987).

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE

05/2012